

# Functional interactions between factor V and TFPI $\alpha$ during onset of blood coagulation

Citation for published version (APA):

van Doorn, P. (2019). Functional interactions between factor V and TFPI $\alpha$  during onset of blood coagulation. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Maastricht University.  
<https://doi.org/10.26481/dis.20190501pd>

**Document status and date:**

Published: 01/01/2019

**DOI:**

[10.26481/dis.20190501pd](https://doi.org/10.26481/dis.20190501pd)

**Document Version:**

Publisher's PDF, also known as Version of record

**Please check the document version of this publication:**

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

**General rights**

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

[www.umlib.nl/taverne-license](http://www.umlib.nl/taverne-license)

**Take down policy**

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

[repository@maastrichtuniversity.nl](mailto:repository@maastrichtuniversity.nl)

providing details and we will investigate your claim.

# CHAPTER 7

Summary





## SUMMARY

Coagulation factor V (FV) is a pivotal regulator of thrombin formation, as it has both pro- and anticoagulant properties. The procoagulant activity of FV as an essential cofactor of factor Xa (FXa) in the prothrombinase complex requires activation of FV to FVa by limited proteolysis of the FV B-domain. Activation is initiated by FXa, which cleaves FV at the Arg<sup>709</sup> and Arg<sup>1018</sup> sites, removing the B-domain basic region and generating the activation intermediate FV(a). FV(a) has increased affinity for FXa, but its prothrombinase activity is inhibited by tissue factor pathway inhibitor- $\alpha$  (TFPI $\alpha$ ), whose basic C-terminus binds to the acidic region in the B-domain of FV(a). Only after the final cleavage of FV(a) at Arg<sup>1545</sup>, which removes the acidic region, FV becomes fully activated (FVa) and committed to the procoagulant pathway. The anticoagulant properties of FV are largely mediated by TFPI $\alpha$ . FV acts as a carrier of TFPI $\alpha$ , thereby prolonging its half-life in the circulation, and enhances the inhibition of FXa by TFPI $\alpha$ .

TFPI $\alpha$  has particularly high affinity for FV forms that lack the basic region, such as the splicing isoform FV-short. Lack of the basic region makes FV-short constitutively active as a cofactor to FXa in prothrombinase. Moreover, exposure of the acidic region increases the affinity of FV-short to TFPI $\alpha$ , making FV-short a better carrier and cofactor of TFPI $\alpha$ . While FV-short is present in all healthy individuals, it was originally discovered in a family with the so-called East Texas bleeding disorder, which is caused by the genetic up-regulation of FV-short. Later, over-expression of a similar but distinct FV-short isoform was found responsible for the analogous Amsterdam bleeding disorder.

This thesis focusses on the functional interactions between FV and TFPI $\alpha$  and the consequences of this interaction for both TFPI $\alpha$  and FV. Additionally, assays have been developed to quantify the susceptibility of FV to inhibition by TFPI $\alpha$  and to measure the concentration FV-short in plasma.

**Chapter 1** provides a general introduction to hemostasis and specifically the coagulation cascade. Extensive information is provided on the structure, function and regulation of the various forms of FV. Finally, the role of TFPI $\alpha$  and its interaction with FV is described in detail.

In **Chapter 2** we demonstrate that FV expresses cofactor activity to TFPI $\alpha$  in plasma. By titrating FV in FV-depleted plasma, we observed that thrombin generation increases between 0 and 5% FV, but progressively decreases at higher FV concentrations. This anticoagulant effect was dependent on the presence of TFPI $\alpha$ . Similar titrations with the glycosylation isoforms FV1 and FV2, which differ in their affinity for phospholipids, showed that this cofactor activity is dependent on phospholipid binding and mainly mediated by the FV2 isoform.

Following the effect of FV on TFPI $\alpha$  described in Chapter 2, in **Chapter 3** we examined how the interaction between FV and TFPI $\alpha$  affects FV. To this end, a peptide resembling the C-terminus of TFPI $\alpha$  (TFPI $\alpha$  C-term) was used to isolate the anticoagulant effects of the FV-TFPI $\alpha$  interaction from the inhibitory functions of the Kunitz domains of TFPI $\alpha$ . The effect of the TFPI $\alpha$  C-term was investigated in thrombin generation experiments and on FV activation in model systems. TFPI $\alpha$  C-term was found to inhibit thrombin generation triggered with tissue factor or FXa. The observation that FV-depleted plasma reconstituted with FVa was not inhibited by the TFPI $\alpha$  C-term pointed at FV activation and/or prothrombinase activity as the target of the inhibition. By following FV activation over time using Western-blot analysis, we observed that cleavage at the Arg<sup>1545</sup> site was inhibited in the presence of TFPI $\alpha$  C-term. This inhibition was even more pronounced in FV-short. Protection of the Arg<sup>1545</sup> cleavage site is an important regulatory mechanism of TFPI $\alpha$ , because cleavage at this position abolishes all anticoagulant functions of FV and commits FVa to its procoagulant function.

The inhibition of FV activation and prothrombinase activity by the TFPI $\alpha$  C-terminus may be of physiological importance if different forms of FV differ in their susceptibility to TFPI $\alpha$ . In fact, FV Leiden (FVL), associated with a thrombotic risk, has been reported to be less susceptible to inhibition by TFPI $\alpha$ , while FV-short has increased affinity for TFPI $\alpha$ . In **Chapter 4** we describe the development of an assay that measures the susceptibility of FV for the TFPI $\alpha$  C-terminus. The assay uses highly diluted plasma as a source of FV, which is pre-activated with FXa in the presence and absence of the TFPI $\alpha$  C-terminal peptide. After activation, prothrombinase is started by the addition of a mixture containing prothrombin and chromogenic substrate for thrombin, and absorbance is followed for 30 minutes in a plate reader. The ratio of the prothrombinase rates obtained in the presence and absence of TFPI $\alpha$  C-term (TFPIr) was taken as a measure of TFPI-resistance. The assay was validated using plasmas of heterozygous and homozygous FVL carriers (which showed increased TFPIr) and carriers of the FV Amsterdam mutation (which showed markedly decreased TFPIr). This assay provides a tool to investigate whether the susceptibility of FV to TFPI $\alpha$  is associated with the risk of thrombosis or bleeding in the general population.

During the development of the assay described in Chapter 4, we noticed that the prothrombinase rate in the absence of TFPI $\alpha$  C-term was sensitive to the amount of FV-short. This was likely caused by the intrinsic FXa-cofactor activity of FV-short. This property of FV-short was exploited in **Chapter 5** for the development of an assay that quantifies the FV-short concentration in plasma. In this assay FV is not pre-activated, in an attempt to make prothrombinase activity entirely dependent on FV-short. In this way, the obtained prothrombinase rates would reflect the amount of FV-short present in plasma. Preliminary results suggest that this is indeed the case, although other plasma determinants cannot be excluded. Validation of the assay in a small population of 45 healthy individuals is still ongoing.

**Chapter 6** discusses the findings of this thesis and gives an overview of the conclusions. The results are analyzed in light of published literature and unresolved questions that are of interest for future research are discussed.



# ADDENDUM

Samenvatting







## SAMENVATTING

Stollingsfactor V (FV) vervult een centrale rol in de trombinevorming omdat het zowel stollende als antistollende eigenschappen heeft. FV dient eerst te worden geactiveerd voordat het zijn stollende functie kan uitoefenen als de essentiële cofactor van factor Xa (FXa) in het protrombinase complex. Deze activering bestaat uit de verwijdering van het FV B-domein door middel van proteolyse. Activering van FV begint met het knippen op Arg<sup>709</sup> en Arg<sup>1018</sup> door FXa. Hierdoor wordt de basische regio uit het B-domein van FV verwijderd wat zorgt voor de vorming van de FV tussenvorm FV(a). FV(a) heeft een hogere affiniteit voor FXa, maar kan tegelijkertijd worden geremd in het protrombinase complex door tissue factor pathway inhibitor- $\alpha$  (TFPI $\alpha$ ), waarvan de C-terminus de acidische regio van FV bindt. Pas na de laatste knip op Arg<sup>1545</sup>, waardoor de acidische regio van FV wordt verwijderd, wordt FV compleet geactiveerd (FVa) tot een volledig stollend eiwit. De antistollende eigenschappen van FV worden voornamelijk gemedieerd via TFPI $\alpha$ . Zo is FV een drager van TFPI $\alpha$ , waardoor de halfwaarde tijd van TFPI $\alpha$  in de bloedsomloop wordt verlengd. Daarnaast draagt FV bij aan de remming van FXa door TFPI $\alpha$ .

TFPI $\alpha$  heeft een uitzonderlijk hoge affiniteit voor FV varianten die de basische regio missen, zoals de splicing isovorm FV-short. Het ontbreken van de basische regio zorgt ervoor dat FV-short intrinsiek actief is als cofactor voor FXa. Bovendien zorgt de blootgestelde acidische regio ervoor dat FV-short een betere drager en cofactor is voor TFPI $\alpha$ . FV-short komt voor in elk gezond individu, maar is oorspronkelijk ontdekt in een familie met de "East-Texas" genetische mutatie die zorgt voor een verhoging van de FV-short expressie. Kort hierna is in een familie uit Amsterdam een soortgelijke mutatie gevonden die zorgt voor een vergelijkbare, maar net wat andere vorm van FV-short.

In dit proefschrift ligt de focus op de functionele interacties tussen FV en TFPI $\alpha$  en de consequenties van deze interacties voor zowel TFPI $\alpha$  als FV. Verder beschrijft dit werk de ontwikkeling van assays om de gevoeligheid van FV voor TFPI $\alpha$  te meten en om de concentratie van FV-short in plasma te bepalen.

**Hoofdstuk 1** geeft een algemene inleiding over de hemostase en spitst zich daarna toe op de stollingscascade. Hierin wordt uitgebreid de structuur, functie en regulatie van de verschillende FV varianten besproken. Tot slot wordt de rol van TFPI $\alpha$  en zijn interactie met FV in detail beschreven.

In **Hoofdstuk 2** laten we zien dat FV cofactor activiteit heeft voor TFPI $\alpha$  in plasma. Door FV te titreren in FV-gedepleteerd plasma zagen we dat de trombinegeneratie omhoog ging tussen 0 en 5% FV maar daarna progressief afnam bij hogere concentraties FV. Dit antistollende effect

was afhankelijk van de aanwezigheid van TFPI $\alpha$ . Wanneer vergelijkbare titraties werden gedaan met de glycosylering isovormen FV1 en FV2, welke verschillen in hun affiniteit voor fosfolipiden, zagen we dat deze cofactor activiteit afhankelijk is van fosfolipidenbinding en voornamelijk wordt gemedieerd door FV2.

Als gevolg van het effect van FV op TFPI $\alpha$ , zoals beschreven in Hoofdstuk 2, wilden we in **Hoofdstuk 3** onderzoeken hoe de interactie tussen FV en TFPI $\alpha$  de werking van FV beïnvloedt. Om dit te bewerkstelligen hebben we een peptide gebruikt dat lijkt op de C-terminus van TFPI $\alpha$  (TFPI $\alpha$  C-term) om geen interferentie te hebben van de remmende eigenschappen van de Kunitz domeinen die aanwezig zijn in het volledige TFPI $\alpha$  molecuul. Het effect van de TFPI $\alpha$  C-term werd onderzocht middels trombinegeneratie experimenten en FV activering in model systemen. TFPI $\alpha$  C-term remde de trombinegeneratie wanneer deze werd gestart met tissue factor of FXa. De waarneming dat FV-gedepleteerd plasma gereconstitueerd met FVa niet geremd werd door het peptide wees erop dat de activering van FV of het protrombinase complex werd geremd. Door de activatie van FV in de tijd te volgen met Western-blot analyse zagen we dat de knip op Arg<sup>1545</sup> was geremd in de aanwezigheid van TFPI $\alpha$  C-term. Deze remming was zelfs nog sterker in FV-short. Bescherming van de Arg<sup>1545</sup> knip is een belangrijk regulatorisch mechanisme van TFPI $\alpha$  omdat deze knip er voor zorgt dat alle antistollende eigenschappen van FV verloren gaan en FVa alleen nog stollende functies heeft.

De remming van de FV activering en de protrombinase activiteit door de TFPI $\alpha$  C-terminus kunnen van fysiologisch belang zijn wanneer verschillende FV varianten een andere gevoeligheid voor TFPI $\alpha$  hebben. Het is al beschreven dat FV Leiden (FVL), dat is geassocieerd met een verhoogd risico op trombose, minder gevoelig is voor remming door TFPI $\alpha$  terwijl FV-short juist een verhoogde affiniteit heeft voor TFPI $\alpha$ . In **Hoofdstuk 4** wordt de ontwikkeling van een assay beschreven die de gevoeligheid van FV voor de TFPI $\alpha$  C-terminus kan meten. De assay maakt gebruik van sterk verdund plasma als bron van FV dat wordt geactiveerd met FXa in de aan- en afwezigheid van het TFPI $\alpha$  C-term peptide. Daarna wordt de protrombinase gestart middels toevoeging van een reactiemengsel bestaande uit protrombine en chromogeen substraat voor trombine. De absorptie wordt vervolgens gemeten in een plate reader gedurende 30 minuten. De ratio die wordt verkregen uit de trombine vorming in de aan- en afwezigheid van de TFPI $\alpha$  C-term (TFPIr) wordt gebruikt om de TFPI-resistentie uit te drukken. De assay is gevalideerd met plasma van heterozygote en homozygote dragers van de FVL mutatie (welke resulteerde in een verhoogde TFPIr) en dragers van de FV Amsterdam mutatie (welke resulteerde in een aanzienlijk lagere TFPIr). Deze assay voorziet nu in een mogelijkheid om te onderzoeken of de gevoeligheid van FV voor TFPI $\alpha$  is geassocieerd met een risico op trombose of bloedingen in een algemene populatie.

Gedurende de ontwikkeling van de assay die beschreven is in hoofdstuk 4 viel het ons op dat de protrombinase snelheid in de afwezigheid van de TFPI $\alpha$  C-term erg gevoelig was voor de hoeveelheid FV-short. Een verklaring hiervoor is de intrinsieke FXa cofactor activiteit van FV-short. Deze eigenschap van FV-short wordt gebruikt in **Hoofdstuk 5** voor de ontwikkeling van een assay die de hoeveelheid FV-short in plasma kan bepalen. In deze assay vindt geen activering van FV plaats om zo de protrombinase activiteit in zijn geheel afhankelijk te maken van FV-short. Op deze manier zou de protrombinase activiteit een reflectie zijn van de hoeveelheid FV-short in het plasma. De voorlopige resultaten suggereren inderdaad dat dit het geval is, maar andere plasma determinanten kunnen nog niet worden uitgesloten. Validatie van de assay in een kleine populatie van 45 individuen is nog gaande.

**Hoofdstuk 6** bediscussieert de bevindingen van dit proefschrift en geeft een overzicht van de conclusies. De resultaten zijn geanalyseerd aan de hand van gepubliceerde literatuur en onbeantwoorde vragen die van interesse zijn voor toekomstig onderzoek worden besproken.